

Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Ozana Frigan

Priprava piridinona i njegovih derivata iz piranona

doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Osijek, 2017.g

Sadržaj

SAŽETAK

ABSTRACT

1. UVOD	1
1.1. CILJ I SVRHA	1
2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. HIDROKSIPIRANONI	3
2.1.1. MALTOL	3
2.1.2. BIOLOŠKA AKTIVNOST	4
2.2. HIDROKSIPIRIDINONI	7
2.2.1. PRIPRAVA 3-HIDROKSIPIRIDIN-4-ONA IZ HIDROKSIPIRANONA	8
2.2.2. MEHANIZAM	8
2.2.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI I METODE	15
3.2. Priprava 1-(m-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona u prisutnosti p-TsOH kao katalizatora	16
3.2.1. Priprava 1-(m-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona u prisutnosti p-TsOH kao katalizatora u autoklavu	16
3.2.2. Priprava 1-(m-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona u prisutnosti p-TsOH kao katalizatora zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluks	17
3.3. Priprava 1-(m-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona u prisutnosti HCl kao katalizatora	18
3.3.1. Priprava 1-(m-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona u prisutnosti HCl kao katalizatora zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluks	18
3.3.2. Priprava 1-(m-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona u prisutnosti HCl kao katalizatora u autoklavu	18
3. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Utjecaj reakcijskih uvjeta na prinos produkta	20
4.1.1. Priprava 1-(m-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona u prisutnosti p-TsOH kao katalizatora	20
4.1.2. Priprava 1-(m-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona u prisutnosti HCl kao katalizatora	21
4.2. Utjecaj kiselog katalizatora na prinos produkta	21
4. ZAKLJUČAK	22
5. LITERATURA	23
6. PRILOZI	26
6.1. POPIS OZNAKA KRATICA I SIMBOLA	26

SAŽETAK

U ovom radu opisana je priprava spoja **3**, 1-(*m*-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona u različitim reakcijskim uvjetima. Spoj **3** pripada skupini 3-hidroksipiridin-4-ona a u svojoj strukturi sadrži slobodnu amino i hidroksilnu skupinu. Kao polazni reagens za sintezu spoja **3** korišten je 3-hidroksi-2-metilpiran-4-on (maltol) koji pripada skupini 3-hidroksipiran-4-ona. U ovom radu provedene su 4 sinteze spoja **3** koje podrazumijevaju promjenu reakcijskih uvjeta (autoklav, refluks) te promjenu vrste kiselog katalizatora (*p*-TsOH, HCl).

Strukture spojeva su pretpostavljene IR spektroskopijom.

Ključne riječi : Biološka aktivnost, direktna sinteza, 3-Hidroksipiran-4-oni, 3-Hidroksipiridin-4-oni, maltol

ABSTRACT

In this paper, the preparation of compound **3**, 1-(*m*-aminophenyl)-3-hydroxy-2-methylpyridin-4-one under various reaction conditions is described. Compound **3** is one representative of 3-hydroxypyridin-4-ones and in its structure contains a free amino and hydroxyl group. As a starting material for the synthesis of compound **3** 3-Hydroxy-2-methylpyran-4-one (maltol), one representative of 3-hydroxypyran-4-ones, was used. In this paper, 4 syntheses of compound **3** were carried out, which imply a change in reaction conditions (autoclave, reflux) and change of acid catalysts (*p*-TsOH, HCl).

The structure of the compounds was assumed by IR spectroscopy.

Key words: Biological activity, direct synthesis, 3-Hydroxypyran-4-ones, 3-Hydroxypyridin-4-ones, maltol

1. UVOD

Hidroksipiridinoni (HP) su heterociklički aromatski spojevi koji sadrže dušikov atom u prstenu te su veoma važni kao bidentatni ligandi za tvrde metale kao što su Fe^{3+} i Al^{3+} . 3-hidroksi-4-piridinoni (3,4-HP) se koriste kao kelirajući agensi. ^{1,2}

Hidroksipiridinoni u svojoj strukturi sadrže šesteročlani prsten na kojem su moguća modificiranja na određenim mjestima u prstenu, te se na taj način podešavaju željena svojstva spoja. Prvenstveno se, tako dobiveni spojevi, koriste u medicini. Tijekom modificiranja strukture, mjesta za vezanje iona metala se ne mijenjaju. ¹

Svestrani su kelatori zbog svojstva vezanja trovalentnih i dvovalentnih metalnih kationa. Najviše se proučavaju upravo u svrhu keliranja željeza *in vivo* i oralnu primjenu zbog svojih dobrih fizikalno-kemijskih i farmakoloških svojstava. Također su provedena istraživanja u svrhu ispitivanja njihovih antineurodegenerativnih i antitumorskih svojstava. ²

Hidroksipiranoni su također heterociklički aromatski spojevi koji umjesto dušika sadrže kisik u svojoj strukturi. Njihovi najpoznatiji predstavnici su 3-hidroksi-2-metil-4-piranon (maltol) i 3-hidroksi-2-etil-4-piranon (etil maltol). Hidroksipiranoni se mogu lako sintetizirati a mnogi su i komercijalno dostupni. Koriste se kao polazni materijali za sintezu biološki aktivnih spojeva te za sintezu hidroksipiridinona. Na šesteročlanom heterocikličkom prstenu mogu se odvijati različite reakcije. Tako se npr. na položaju 1 odvija pretvorba u hidroksipiridinone reakcijom sa amonijakom, primarnim aminima ili aminokiselinama. ³ Vezanje alkilne ili arilne grupe može se postići reakcijama sa diacilperoksidima ili diarilperoksidima. ⁴

1.1. CILJ I SVRHA

Cilj ovog završnog rada jest priprava 1-(*m*-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona (spoj **3**). Spoj **3** pripada skupini 3-hidroksi-piridin-4-ona a literaturno je poznato da takvi spojevi posjeduju veliki afinitet prema metalnim ionima, naročito Fe^{3+} i Al^{3+} što je razlog njihove velike biološke aktivnosti. ^{1,2} Spoj **3** u svojoj strukturi sadrži hidroksilnu i amino skupinu slične reaktivnosti što pruža mogućnost pripreme velikog broja njegovih derivata. Spoj

3 u ovome radu pripremljen je na 4 različita načina s ciljem ispitivanja utjecaja vrste kiselog katalizatora i reakcijskih uvjeta na prinos produkta. U tu svrhu kao kiseli katalizatori korišteni su *p*-TsOH i HCl a reakcija je provedena u autoklavu te klasičnim zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluks.

2.LITERATURNI PREGLED

2.1. HIDROKSIPIRANONI

Hidroksipiranoni su prirodni spojevi, te osim što se nalaze u raznim biljkama, lako se mogu sintetizirati.³

Maltol i etil maltol su najpoznatiji spojevi ove skupine heterocikličkih spojeva (Slika 1). Maltol je poznat po svojoj netoksičnosti i velikoj biokompatibilnosti.⁵ Može se izolirati iz slada, kore ariša te iz borovih iglica.³ Upotrebljavaju se kao polazni materijali u sintezama hidroksipiridinona, kao što je i u ovom radu maltol korišten kao jedan od reaktanata. Ovi spojevi su kelatori dvovalentnih i trovalentnih metalnih iona s promjenjivom selektivnošću i afinitetom vezanja. Veoma su ugodna mirisa i okusa te se zato koriste kao pojačivači okusa i konzervansi.⁵ Također, maltol se koristi i kao aditiv u hrani (E636 i E637) te joj daje sladni okus, stoga se dodaje u hranu poput kruha, kolača te piva.⁶

Hidroksipiranoni su heterociklički spojevi koji sadrže atom kisika u svojem šesteročlanom prstenu. Vrlo su česti strukturni motivi u biološki aktivnim spojevima koji se lako mogu sintetizirati za razne primjene.³ Kod 3-hidroksipiran-4-ona najreaktivniji je položaj broj 2, što je posljedica pozitivnog rezonantnog efekta u bazičnim uvjetima, te zato podliježe aldolnoj kondenzaciji⁷ i Mannichovoj reakciji⁸. Ako je položaj 2 zauzet, sljedeća pozicija na kojoj će se odvijati reakcija je na položaju broj 5 koji se može funkcionalizirati Mannichovom reakcijom.⁹

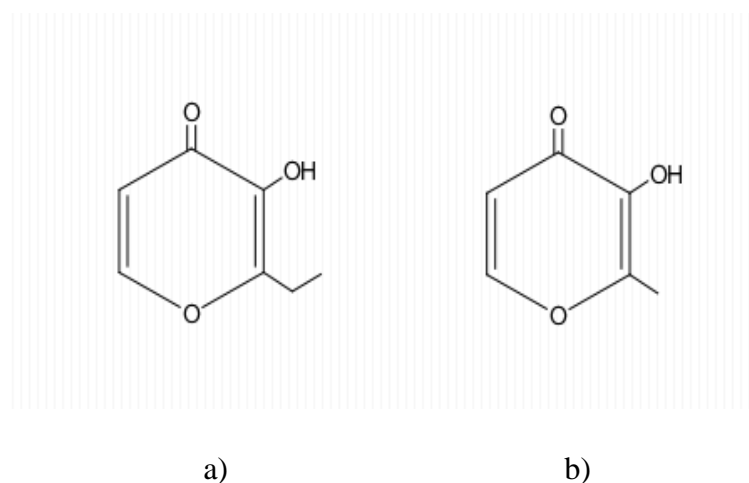
Hidroksipiranoni se mogu lako prevesti u heterocikličke derivate piridina, hidroksipiridinone reakcijama sa amonijakom ili primarnim aminima uz zagrijavanje u zatvorenoj cijevi, no te reakcije daju slaba iskorištenja i dugotrajne su.^{10, 11}

2.1.1.MALTOL

Maltol je kristalna tvar bijele boje veoma ugodnog mirisa i okusa i kao takav se često koristi u prehrambenoj industriji. Nalazi se u kavi, mlijeku, kakau te jagodama.¹² Sa željezom tvori komplekse topljive u vodi te se zbog toga ispituje kao mogući suplement željeza kod anemije.^{13, 14} U vodenim otopinama, ovisno o pH postoji kao neutralna molekula, anion ili kation.¹⁵

Koristi se kao pojačivač okusa, konzervans te kao prirodni antioksidans. Zbog svojih kelatorskih svojstava također je pronašao praktičnu primjenu u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji te u kemiji hrane. Uz mnoge raznolike primjene u novije vrijeme se sve više proučava primjena maltola u medicini, te su tako otkrivena njegova antitumorska svojstva, mogućnost inhibicije oksidativnog stresa i zaštita živčanih stanica u slučaju oksidativnih oštećenja uzrokovanih bolestima kao npr. dijabetes.¹⁶

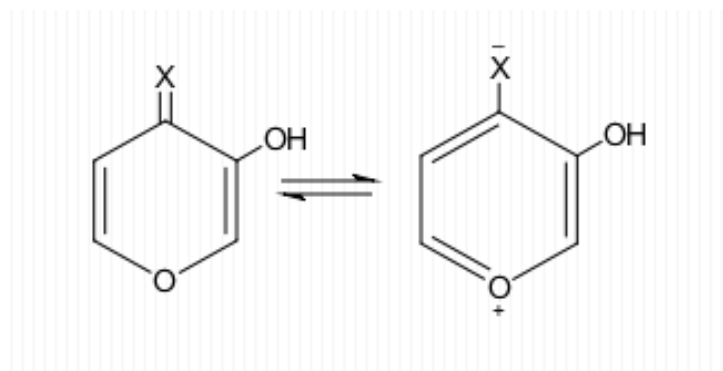
Maltol se može pripremiti iz piromekonske kiseline Mannichovom reakcijom sa formaldehidom i piperidinom nakon čega slijedi redukcija uz paladij na aktivnom ugljiku.¹⁷ Za sintezu se još koristi i metoda koja podrazumijeva upotrebu derivata dimetoksiliranog furfurilnog alkohola pri čemu dolazi do širenja prstena, epoksidacije i kiselo katalizirane pregradnje.¹⁸



Slika 1. a) etil maltol, b) maltol

2.1.2.BIOLOŠKA AKTIVNOST

Kelirajuća svojstva hidroksipiridinona i hidroksipiranona se mogu objasniti visokim afinitetom prema metalnim ionima. Kompleksi koje tvore s metalnim ionima, primjerice Fe^{3+} , su izrazito stabilni. Svojstvo bidentatnog liganda se može objasniti zwitterionskom strukturom heterocikličkog sustava (Shema 1).³



Shema 1. Rezonantne strukture 3-hidroksipiran-4-ona X= O, S

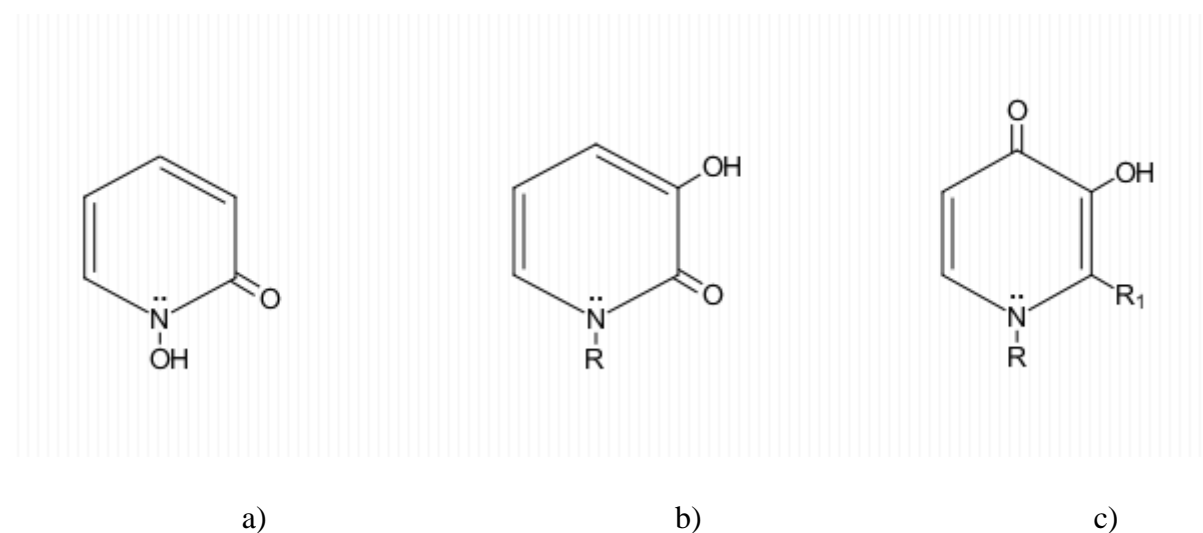
Hidroksipiranoni su biološki aktivni spojevi koji su pronašli svoju primjenu u medicini kao suplementi željeza. Ovakva primjena je rezultat njihovog svojstva da vežu željezo ali slabije od hidroksipiridinona, te na taj način kada se nađu u tijelu, pri fiziološkim uvjetima, otpuštaju željezo. Pokazalo se da imaju bolju učinkovitost i bioraspoloživost od soli željeza. Kompleksi željeza sa maltolom i etil maltolom pokazali su svojstva koja su vrlo korisna, kao što su veća stabilnost kompleksa, u odnosu na soli željeza.¹⁹ Ispitivanjem bioraspoloživosti *in vivo*, piranonski kompleksi željeza su pokazali bolje rezultate u odnosu na FeSO₄.²⁰ Ta veća stabilnost kompleksa onemogućuje trenutnu hidrolizu te taloženje željeza. Nedostatak, kod primjene drugih suplemenata, je bio to što su potrebne velike doze željeza kako bi se postigao terapijski učinak jer pri fiziološkom pH dio kompleksa željeza se taložio i hidrolizirao. To kod hidroksipiranona nije slučaj te je dovoljna puno manja doza lijeka za pozitivan fiziološki učinak.²⁰

Poznat je kompleks maltola i galija, spoj [tris(maltolato)galij(III)] koji je sintetiziran u svrhu ispitivanja biološke aktivnosti i moguće primjene. Spojevi galija, kao što su galij-klorid i galij-nitrat, pokazali su antineoplastična svojstva dok galij citrat pokazuje antitumorska svojstva.³ Galij.nitrat je korišten kao lijek kod liječenja raka mokraćnih puteva, hiperkalcijemije i limfoma no tijekom njegove primjene su zamijećeni određeni nedostaci kao što su neurotoksičnost i nefrotoksičnost te niska bioraspoloživost.²¹ Iz tog razloga bilo je neophodno pronaći koordinacijski spoj galija koji ne hidrolizira te pokazuje poboljšanu bioraspoloživost. [Tris(maltolato)galij(III)] pokazao je veliku bioraspoloživost, mogućnost oralne primjene te veću lipofilnost od predhodno navedenih galijevih soli.²² Galij(III) pokazuje slična koordinacijska svojstva kao i željezo(III) te bi trebao imati sličan metabolički put u organizmu.^{23, 24} Značajna razlika između galija(III) te željeza(III) je to što je galij(III) inertan i

nema mogućnost sudjelovanja u oksidacijsko-redukcijskim procesima te ne sudjeluje u biološkim procesima.²⁵

2.2. HIDROKSIPIRIDINONI

Hidroksipiridinoni su heterociklički spojevi koji sadrže dušikov atom u prstenu te (*O*, *O*) kelirajuću skupinu. Hidroksilna i keto skupina su zaslužne za njihovu moć keliranja. Međusobno se nalaze u *ortho* položaju.³ Hidroksipiridinoni su podijeljeni na 1-hidroksipiridin-2-one (1,2 HP), 3-hidroksipiridin-2-one (3,2 HP), i 3-hidroksipiridin-4-one (3,4-HP), s obzirom na položaj hidroksilne i keto skupine na prstenu u odnosu na dušikov atom u prstenu (Slika 2). Kod 3,4 HP hidroksilna skupina se nalazi na položaju 3 a keto skupina na položaju 4 što daje hidroksilnu skupinu s najvišom bazičnosti čiji je pKa između 9 i 9,5.²⁶ Isto tako, elektronska gustoća između koordinirajućih atoma je najviša. Navedena svojstva, ove kelatore, čine neutralnima pri fiziološkom pH.²² HP podliježu funkcionalizaciji kako bi se poboljšala njihova biološka raspoloživost, oralna aktivnost te lipofilnost što je rezultiralo razvojem raznih hidroksipiridinonskih derivata kao što su bidentatni^{27, 28, 29}, tetradentatni^{30, 31}, heksadentatni³² i oktaadentatni³³ kelatori. Vezanjem određenih funkcionalnih skupina moguće je prilagoditi fizikalno-kemijska svojstva i biološka svojstva, kako bi se omogućila ciljana biodistribucija u određenim organima i/ili tkivima. Tako npr. postoje 3,4-HP glukozidni derivati kojima je poboljšana bioraspoloživost i imaju sposobnost prepoznavanja glukoznih transportera.¹ Hidroksipiridinoni tvore stabilnije komplekse od odgovarajućih hidroksipiranona. Zbog tog svojstva hidroksipiranoni se mogu upotrebljavati kao izvori metalnih iona u tijelu kod patoloških stanja koja su uzrokovana nedostatkom esencijalnih metala.³

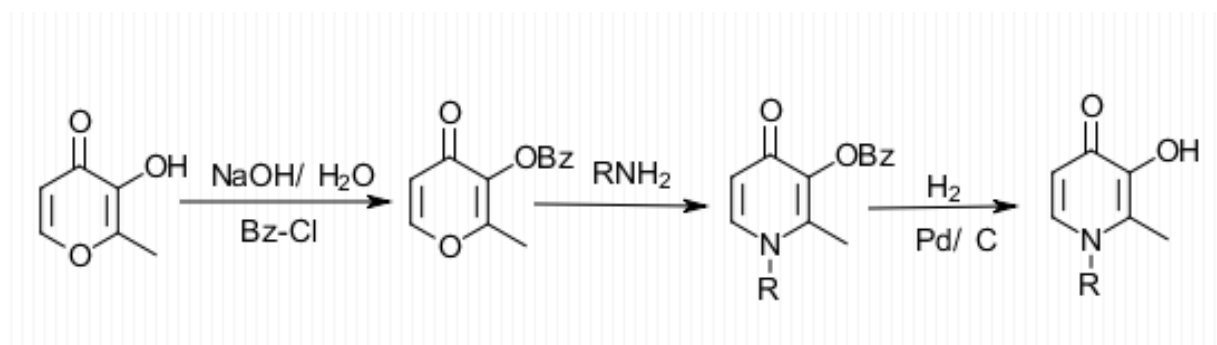


Slika 2. Podjela hidroksipiridinona: a) 1,2- HP, b) 3,2- HP, c) 3,4- HP

2.2.1.PRIPRAVA 3-HIDROKSIPIRIDIN-4-ONA IZ HIDROKSIPIRANONA

Za pripravu hidroksipiridinona literaturno su poznate dvije metode koje se nazivaju Harrisova³⁴ metoda te direktna metoda priprave³⁵.

Harrisova metoda je metoda u kojoj se iz piranonskih derivata, kao što je maltol, dobivaju željeni *N*-alkilni i *N*-arilni hidroksipiridinoni te se sastoji od 3 koraka. U prvom koraku se na hidroksilnu skupinu, koja se nalazi na položaju 3, uvodi eterska zaštitna skupina. U sljedećem koraku dolazi do reakcije primarnog amina i zaštićenog piranonskog derivata. Nastaje *N*-supstituirani spoj, piridinonski derivat. Završni korak ove metode je uklanjanje zaštitne skupine hidrogenolizom (Shema 2).^{36, 37}



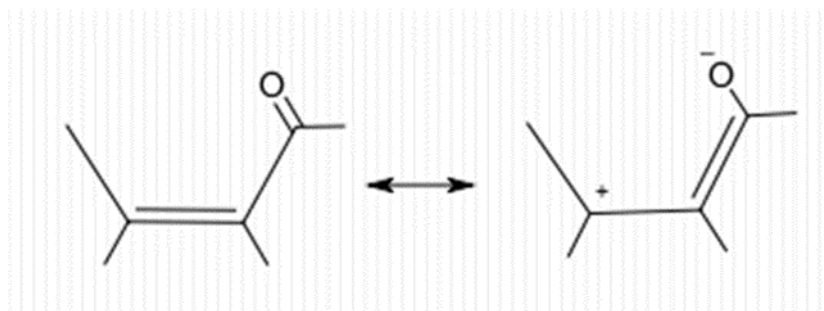
Shema 2. Harrisova metoda sinteze 3-hidroksipiridin-4-ona³⁷

Kod direktne metode priprave hidroksipiridinona zagrijava se nezaštićeni piranonski derivat i odgovarajući primarni amin u vodenoj otopini. Reakcija se odvija u samo jednom koraku uz mogućnost dodatka katalizatora. Kao katalizator se koriste Brønstedove kiseline (HCl, H₂SO₄, *p*-TsOH)^{35, 37-40}

Usporedbom ovih dviju metoda se došlo do zaključka da se kod Harrisovog postupka dobivaju veći prinosi željenog produkta.³⁶

2.2.2.MEHANIZAM

Mehanizam nastajanja hidroksipiridinona je Michaelova adicija. Adicija se odvija na položajima 2 i 6 heterocikličkog prstena α,β - nezasićenog karbonilnog spoja. 3-Hidroksipiran-4-oni sadrže dvije α,β - nezasićene komponente (Shema 3).



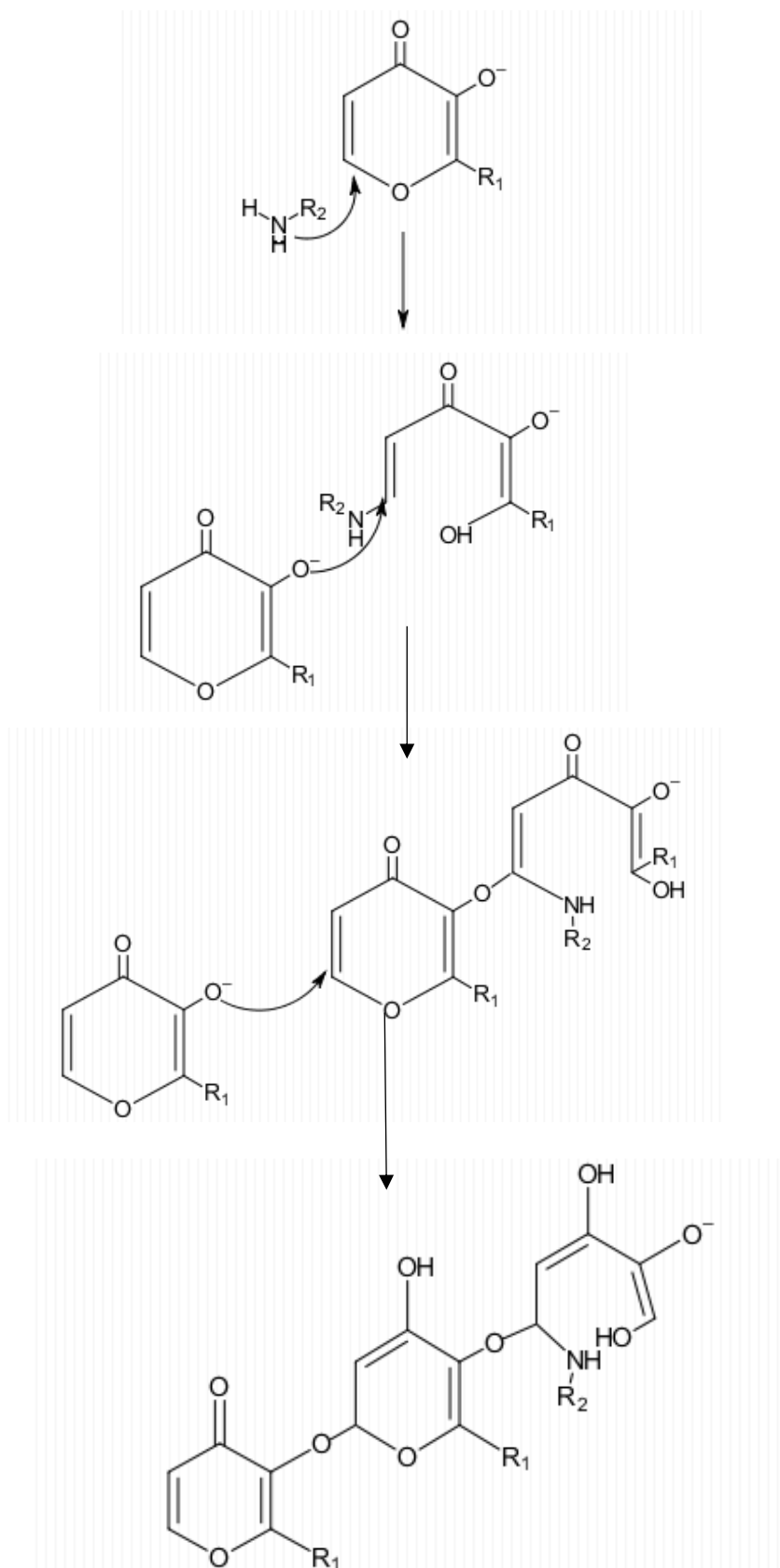
Shema 3. Rezonantne strukture α,β - nezasićenih komponenata

Kao nukleofil se koristi odgovarajući primarni alkil-amin ili aril-amin. Kada se kao nukleofil koristi primarni amin, odvija se dvostruki napad na obje α,β - nezasićene komponente a uz gubitak vode nastaje 3-hidroksipiran-4-on (Shema 4).³⁷



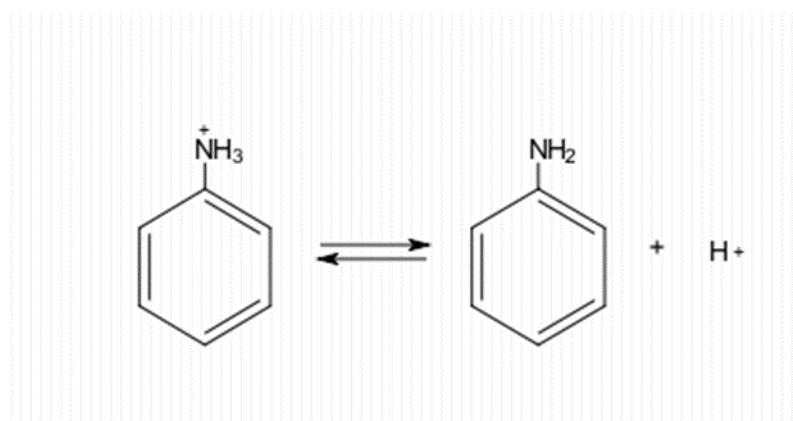
10

nastaje alkoksid. Nastali spoj se ponaša kao nukleofil te dolazi do stvaranja kondenzacijskih nusprodukata (Shema 5).^{36, 37}



Shema 5. Stvaranje kondenzacijskih nusprodukta prilikom pripreve 3,4-HP u bazičnim uvjetima

S druge strane, u kiselim uvjetima može doći do protoniranja amina. U kiselom mediju alkil-amini su gotovo u potpunosti protonirani te na taj način gube nukleofilnost, dok se aril-amini nalaze u ravnoteži s malim udjelom neprotoniranog oblika. Ako se kao nukleofil koristi manje bazičan aril-amin, nije potrebno uvođenje zaštitne skupine nego se reakcija može izvesti direktnom metodom (Shema 6).³⁷ Dodatkom kiselog katalizatora se smanjuje mogućnost nastanka alkoksida a samim time i mogućnost nastanka nusprodukta te smanjenog prinosa željenog produkta.^{36, 37}



Shema 6. Ravnoteža između protoniranog aril-amina i neprotoniranog aril-amina u kiselom mediju

2.2.3.BIOLOŠKA AKTIVNOST

Upotrebom kelirajućih agensa, kod raznih oboljenja uzrokovanih prekomjernim nakupljanjem teških metala u organizmu, uvelike se mogu ublažiti simptomi bolesti. Derivati HP-a se prvenstveno proučavaju te klinički ispituju kao kelatori, no poznata su i antibakterijska i antitumorska djelovanja. Isto tako imaju i potencijalnu upotrebu kao antimalarici i antidementici.^{1,2}

Aluminij je neesencijalni element u ljudskom organizmu te kao takav nema biološkog načina na koji bi se taj aluminij izlučivao iz organizma. Zbog toga se ovaj teški metal može

nakupljati u tkivima te uzrokovati razna patološka stanja kod ljudi kao što su poremećaji s koštanom srži i neurološke bolesti.¹

Željezo je veoma važan element koji se u ljudskom tijelu može naći u raznim metaloproteinima poput hemoglobina ili u citokromima (koji se koriste u metaboličkim putevima kod sinteze ATP-a). Isto tako važan je i kao kofaktor mnogim enzimima. U organizmu se nalazi u topljivom obliku vezanom za transportni protein transferin.²

Koncentracija željeza u tijelu se može promijeniti pojavom nekih određenih bolesti kao što su razni oblici talasemija. Željezo se u tijelu nalazi u dva oksidacijska stanja (Fe^{2+} i Fe^{3+}), ovisno o njegovoj ulozi u tijelu. Kod povišenih koncentracija, njegovo oksidacijsko-redukcijsko svojstvo može biti veoma opasno jer stalnim primanjem ili otpuštanjem elektrona može dovesti do nastanka reaktivnih vrsta odnosno slobodnih radikala. Slobodni radikali ulaze u reakcije sa mnogim biološkim molekulama u tijelu te izazivaju ozbiljna oštećenja organizma.²

3-hidroksipiridin-4-oni (3,4-HP) su izuzetno selektivni prema trovalentnim metalnim ionima u području fiziološkog pH što ih čini odličnim kelatorima. Među najbitnijima se može istaknuti 3-hidroksi-1,2-dimetilpiridin-4-on ili deferipron (Ferriprox). Ovaj spoj je u kliničkoj upotrebi već oko trideset godina a prvenstveno se koristi u liječenju primarne hemokromatoze te raznih oblika talasemije. Hemokromatoza je poremećaj u metabolizmu željeza u tijelu te uslijed toga dolazi do povećanja koncentracije željeza i akumulacije u određenim tkivima i organima. Talasemije su oboljenja uzrokovana nepravilnom proizvodnjom hemoglobina što dovodi do niskih koncentracija hemoglobina u krvi i razaranja crvenih krvnih stanica.² Prije otkrića deferiprona za tretiranje ovih bolesti se koristio spoj desferioksamin B (DFO, Desferal). DFO je imao nekoliko nedostataka kao kelatoterapeutik a to su inaktivnost kod oralne primjene, velika molarna masa i voluminozna struktura. Primjenjivao se intravenozno (16h dnevno, 5-7 dana u tjednu) zbog hidrofilnog karaktera što je dosta otežavalo terapiju.^{1,2} Isto tako nije mogao biti apsorbiran kroz gastro-intestinalni trakt zbog velike molekulske mase. Nasuprot tome, deferipron je lipofilnog karaktera i male molekulske mase no i kod njega su se pokazali određeni nedostaci. Jedan od nedostataka je glukouronidacija hidroksilne skupine piridinonskog prstena u metaboličkom putu u jetrima. Glukouronidacija je proces u organizmu u kojem se glukuronskom kiselinom glikozidira neki spoj kako bi postao topljiviji te se lakše izlučio iz organizma. Kao što je prethodno spomenuto, hidroksilna skupina sudjeluje u kompleksiranju metala te ako se spoj glukouronidira on gubi svoju kelatorsku aktivnost. Zato se lijek primjenjuje u velikim dozama kako bi se postigao terapijski učinak. Još jedan izraženi nedostatak su gastro-intestinalne nuspojave kao što su agranulocitoza i neutropenija.

Agranulocitoza je patološko stanje u kojem dolazi do smanjenja broja leukocita a neutropenija je poremećaj u kojem je smanjen broj neutrofilnih granulocita.²

3,4-HP također posjeduju antineurodegenerativnu aktivnost kod oboljenja kao što su Parkinsonova i Alzheimerova bolest. Određene nepravilnosti u homeostazi metala koji su esencijalni u organizmu (željezo, bakar, cink) dovode do akumulacije proteina tj. nastajanja proteinskih agregata što je karakteristični pokazatelj spomenutih bolesti. Ti agregati se stvaraju u mozgu i na taj način dolazi do disfunkcije sinapsi i neurona.² Ovdje ponovo do izražaja dolazi lipofilni karakter i mala molekulska masa 3,4-HP-a što je ključno kod prolaska krvno-moždane barijere te kod izlučivanja iz organizma.^{1, 2}

Antitumorsko djelovanje 3,4-HP-a se temelji na vezanju željeza iz tumorske stanice. Tumorske stanice, u odnosu na zdrave stanice, imaju povećanu potrebu za željezom jer brzo proliferiraju. Proliferacija je postupak brzog dijeljenja stanica. Keliranjem željeza iz tumorske stanice smanjuje se brzina proliferacije. Na taj način se mijenja metabolizam željeza u stanici.^{41, 42, 43} Tumorske stanice posjeduju velik broj transferinskih receptora što uzrokuje veću potrebu za željezom. Kod sinteze DNA, gdje dolazi do redukcije ribonukleotida u deoksiribonukleotide, jedan od ključnih enzima je ribonukleotid reduktaza (RR). RR-u je potrebno željezo za pravilnu funkciju. Uklanjanjem željeza iz stanice dolazi do inaktivacije enzima što uzrokuje prestanak sinteze DNA a samim time i zaustavlja proliferaciju.²

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.MATERIJALI I METODE

Za sintezu ciljnog produkta korišteni su komercijalno dostupni polazni spojevi, reagensi i otapala: 3-hidroksi-2-metilpiran-4-on (maltol, *Alfa Aesar*), *m*-fenilendiamin (*Alfa Aesar*), etil-acetat(*Carlo Erba*), metanol (*BDH Prolabo*), *para*-toluensulfonska kiselina (*p*-TsOH, *Alfa Aesar*), klorovodična kiselina (*BDH Prolabo*)

Za pročišćavanje primarno dobivenih produkata su korištene prekriztalizacija te kromatografija na stupcu. Za praćenje i kontrolu čistoće spojeva korištena je tankoslojna kromatografija na pločicama silikagela (60F 254, 0,20mm). Vizualizacija je provedena apsorpcijom UV zračenja (254nm). Kod kromatografije na stupcu i tankoslojne kromatografije korištena su sljedeća otapala i sustav otapala:

Sustav otapala A: etil-acetat/metanol, 5:1

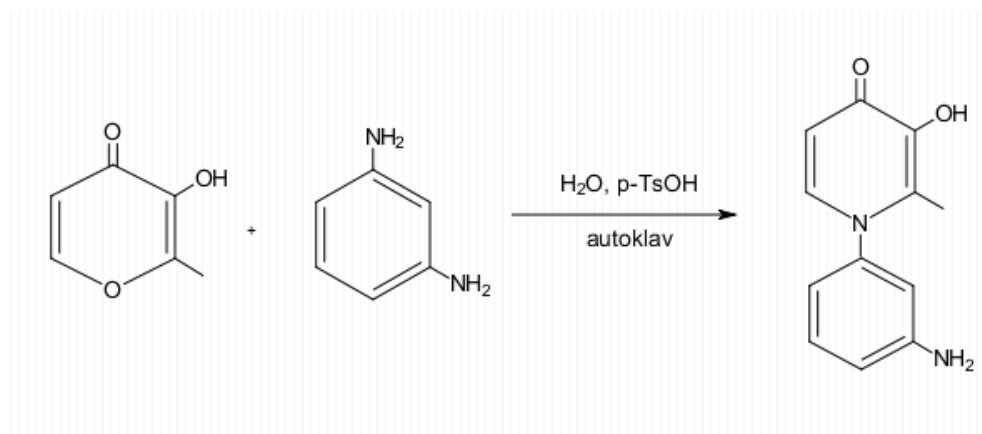
Otapalo B: -metanol

Otapala su uparavana na rotacijskom uparivaču. (*Heidolph*)

3.2. Priprava 1-(*m*-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona u prisutnosti *p*-TsOH kao katalizatora

3.2.1. Priprava 1-(*m*-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona u prisutnosti *p*-TsOH kao katalizatora u autoklavu

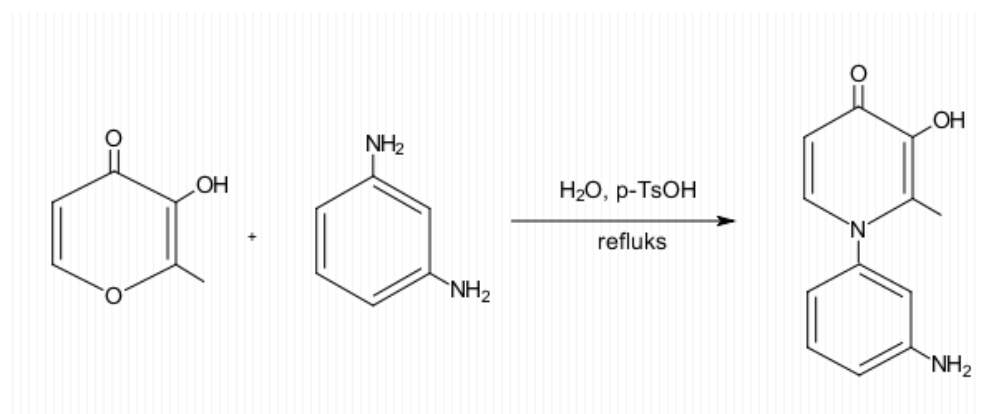
U staklenu cijev dodani su maltol (1g, 7,93mmol), *m*-fenilendiamin (857,6mg, 7,93mmol), *p*-TsOH (150mg, 0,79mmol) i voda (20ml). Staklena cijev je postavljena u metalni nosač koji se zagrijava 48h na 150 °C. Nakon 48 h u staklenoj cijevi dobiven je talog kojemu je dodan metanol. Otopina je profiltrirana preko Buchnerovog lijevka a otapalo je upareno. Dobiven je smeđi kruti produkt (340mg, 19,58%) koji je pročišćen kromatografijom na stupcu uz eluiranje najprije sustavom otapala A zatim otapalom B. ($R_f=0,509$)



Shema 7. Reakcija maltola i *m*-fenilendiamin uz *p*-TsOH kao katalizator u autoklavu

3.2.2. Priprava 1-(*m*-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona u prisutnosti *p*-TsOH kao katalizatora zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluks

U tikvicu su dodani maltol (1g, 7,93mmol), *m*-fenilendiamin (857,6mg, 7,93mmol), *p*-TsOH (150mg, 0,79mmol) i voda (20ml). Reakcijska smjesa je zagrijavana 48h na 150 °C. Nakon 48 h zagrijavanja dobiven je talog kojemu je dodan metanol. Otopina je profiltrirana preko Buchnerovog lijevka a otapalo je upareno. Dobiven je smeđi kruti produkt (489 mg, 28,56%) koji je pročišćen kromatografijom na stupcu uz eluiranje najprije sustavom otapala A a zatim otapalom B. ($R_f=0,456$)

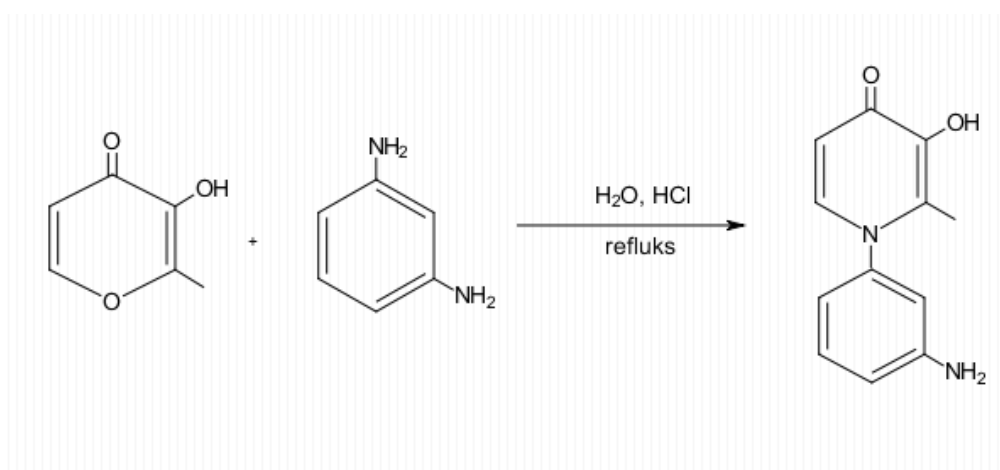


Shema 8. Reakcija maltola i *m*-fenilendiamin uz *p*-TsOH kao katalizator, zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluks

3.3. Priprava 1-(*m*-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona u prisutnosti HCl kao katalizatora

3.3.1. Priprava 1-(*m*-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona u prisutnosti HCl kao katalizatora zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluks

U tikvicu su dodani maltol (1g, 7,93mmol), *m*-fenilendiamin (857,6mg, 7,93mmol), HCl (65,7μl, 0,79mmol) i voda (20ml). Reakcijska smjesa se zagrijava 48h na 150 °C. Nastaje talog koji se otapa u metanolu te filtrira vakuumskom filtracijom preko Büchnerovog lijevka nakon čega je otapalo upareno. Dobiven je smeđi kruti produkt (200mg, 11,68%) koji je pročišćen kromatografijom na stupcu uz eluiranje najprije sustavom otapala A zatim otapalom B. ($R_f=0,511$)

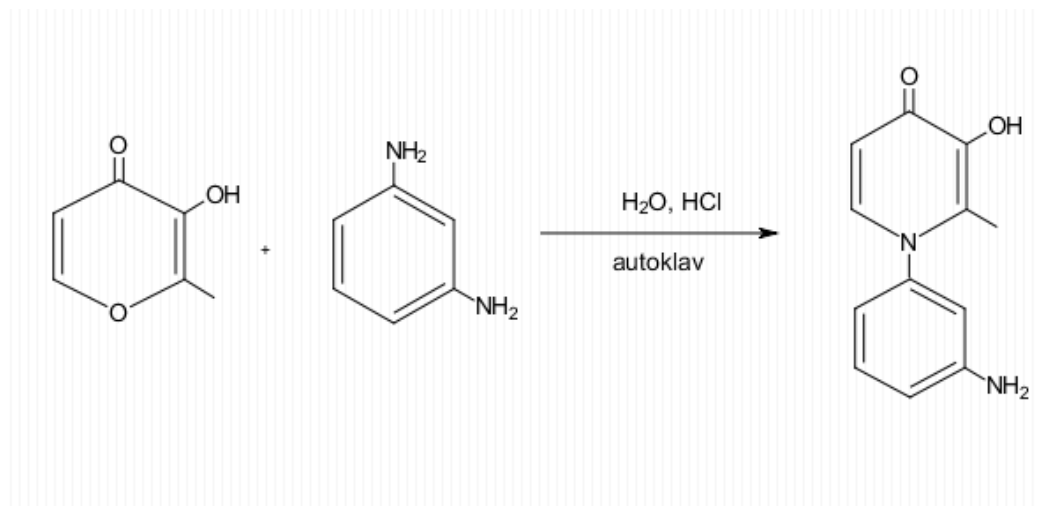


Shema 9. Reakcija maltola i *m*-fenilendiamin uz HCl kao katalizator, zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluks

3.3.2. Priprava 1-(*m*-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona u prisutnosti HCl kao katalizatora u autoklavu

U staklenu cijev su dodani maltol (1g, 7,93mmol), *m*-fenilendiamin (857,6mg, 7,93mmol), HCl (65,7μl, 0,79mmol) i voda (20ml). Staklena cijev je postavljena u metalni nosač koji se zagrijava 48h na 150 °C. Nakon 48 h u staklenoj cijevi dobiven je talog kojemu je dodan metanol. Otopina je profiltrirana preko Buchnerovog lijevka a otapalo je upareno.

Dobiven je smeđi kruti produkt (173mg, 10,10 %) koji je pročišćen kromatografijom na stupcu uz eluiranje najprije sustavom otapala A zatim otapalom B. ($R_f=0,494$)



Shema 10. Reakcija maltola i *m*-fenilendiamin uz HCl kao katalizator u autoklavu

3. REZULTATI I RASPRAVA

1-(*m*-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on u ovome završnom radu pripremljen je na 4 načina. Kao kiseli katalizatori korišteni su *p*-TsOH i HCl a reakcije su provedene u autoklavu te klasičnim zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluks. Sve 4 sinteze su provedene u trajanju od 48 h pri čemu je uvijek kao otapalo korištena voda. Na ovaj način moguće je ispitati utjecaj vrste kiselog katalizatora te reakcijskih uvjeta na prinos produkta.

4.1. Utjecaj reakcijskih uvjeta na prinos produkta

4.1.1. Priprava 1-(*m*-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona u prisutnosti *p*-TsOH kao katalizatora

Sinteza spoja **3** provedena je najprije uz prisutnost *p*-TsOH kao kiselog katalizatora. Takva sinteza provedena je u autoklavu te zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluks. Navedene sinteze provedene su s ciljem ispitivanja utjecaja reakcijskih uvjeta na prinos produkta, a obje sinteze provedene su u trajanju od 48 h. U prvom slučaju sinteze spoja **3** uz *p*-TsOH kao katalizator u autoklavu (19,58%) zbog problema prilikom izolacije samog produkta dobiven je zanemarivo manji prinos u odnosu na klasičnu sintezu u vodenoj otopini uz refluks (28,56%). S druge strane, sinteza spoja **3** zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluks također je rezultirala niskim prinosom a razlog tome je prisutnost velike količine neizreagiranog polaznog spoja (maltola) u reakcijskoj smjesi što je ustanovljeno praćenjem reakcije tankoslojnom kromatografijom. Budući da je spoj **3**, sintetiziran zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluks, izoliran onečišćen polaznim reaktantima njegovo razdvajanje kromatografijom na stupcu (Sustav otapala A, otapalo B u oba slučaja) bilo je puno teže u odnosu na spoj **3** sintetiziran u autoklavu. Prisutnost neizreagiranog maltola u reakcijskoj smjesi upućuje na činjenicu da je za sintezu spoja **3** zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluks potrebno duže vrijeme reakcije u odnosu na sintezu u autoklavu (48h).

4.1.2. Priprava 1-(*m*-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-ona u prisutnosti HCl kao katalizatora

Spoj **3** sintetiziran je direktnom metodom, zagrijavanjem ekvimolarnih količina maltola i *m*-fenilendiamina u vodenoj otopini uz prisutnost HCl kao katalizatora. Reakcija je provedena u autoklavu te zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluks analogno reakcijama sinteze spoja **3** kataliziranim s *p*-TsOH.

Kao i u slučaju sinteze spoja **3** zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluks uz prisutnost *p*-TsOH kao katalizatora, prilikom sinteze spoja **3** zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluks uz HCl kao katalizator praćenjem reakcije s tankoslojnom kromatografijom dokazana je prisutnost veće količine neizreagiranog polaznog spoja (maltola) u reakcijskoj smjesi. Ovakvi rezultati ponovo, kao u slučaju reakcija sinteze spoja **3** kataliziranim s *p*-TsOH ukazuju na činjenicu da je za provođenje sinteza spoja **3** u refluksu potrebno duže vrijeme reakcije u odnosu na reakcije provedene u autoklavu. I u ovome slučaju prinos produkta sintetiziranog u autoklavu (10,10%) je približno jednak produktu sintetiziranom zagrijavanjem uz refluks (11,68%). Razlog niskog prinosa produkta sintetiziranog u autoklavu su problemi prilikom izolacije samog produkta kao i u slučaju reakcije katalizirane s *p*-TsOH.

4.2. Utjecaj kiselog katalizatora na prinos produkta

Spoj **3** u ovome radu pripravljen je direktnom metodom koja podrazumijeva zagrijavanje ekvimolarnih količina maltola i *m*-fenilendiamina u vodenoj otopini u prisutnosti *p*-TsOH ili HCl kao kiselog katalizatora. Iz literature je poznato da upotreba kiselog katalizatora sprječava stvaranje kondenzacijskih produkata koji nastaju reakcijom hidroksilne skupine polaznog hidroksipiranona, u ovome slučaju maltola, i međuprodukata koji nastaju tijekom aminacijskog koraka.^{32, 33}

Spoj **3** u ovome radu pripravljen je reakcijom *m*-fenilendiamina i maltola uz prisutnost HCl ili *p*-TsOH kao katalizatora čime je ispitan utjecaj vrste kiselog katalizatora na prinos produkta. Kada je reakcija provedena uz upotrebu HCl kao kiselog katalizatora dobiveni su manji prinosi u odnosu na reakciju kataliziranu s *p*-TsOH i u slučaju provođenja reakcije u autoklavu i zagrijavanjem vodene otopine uz refluks. Takvi rezultati upućuju na to da je *p*-TsOH pogodniji katalizator za sintezu spoja **3** direktnom metodom.

4. ZAKLJUČAK

Sintetiziran je spoj 1-(*m*-aminofenil)-3-hidroksi-2-metilpiridin-4-on (spoj **3**) direktnom metodom, koja se provodi u jednom reakcijskom koraku. Kao polazni reaktanti korišteni su maltol i *m*-fenilendiamin. Sinteze su provedene u autoklavu i zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluks. Uz polazne reaktante korišteni su i katalizatori HCl i *p*-TsOH.

U slučaju sinteze spoja **3** zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluks primijećene su veće količine neizreagiranog početnog reaktanta, maltola, što dovodi do teže izolacije spoja **3**. Razlog tomu je nedovoljno vrijeme reakcije u odnosu na reakciju u autoklavu, s obzirom da su obje provedene u trajanju od 48h s ciljem njihove usporedbe.

Ispitivanjem utjecaja vrste kiselog katalizatora na prinos rezultati su pokazali kako je *p*-TsOH pogodniji katalizator kod sinteze spoja **3** budući da su uz *p*-TsOH kao katalizator dobiveni nešto veći prinosi u odnosu na reakcije provedene s HCl kao katalizatorom.

5. LITERATURA

1. M. Amelia Santos, Sergio M. Marques, Silvia Chaves , *Coord. Chem. Reviews* **256** (2012) 240- 259
2. Ž. Car, V. Petrović Peroković i S. Tomić Pisarović, *Kem. Ind.* **66** (2017) 17–28
3. W. Kandioller, A. Kurzwernhart, M. Hannif, *J. Organomet. Chem.* **696** (2011) 999 - 1010
4. K. Kawase, K. Hayashi, *J. Arg. Chem. Soc. Jpn.* **46** (1972) 335-339
5. E. J. Gralla, R. B. Stebbins, G. I. Coleman, C. S. Delahunt, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **15** (1969) 604-613
6. R. Bentley *Nat. Prod. Rep.* **23** (2006) 1046-1062
7. Z. D. Liu, H. H. Khord, D. Y. Liu, S. L. Lu, R. C. Hider, *J. Med. Chem.* **42** (1999) 4814-4823
8. M. D. Aytemir, B. Ozcelik, *Eur. J. Med. Chem* **45** (2010) 4089-4095
9. Y. Ma, W. Luo, P. J. Quinn, Z. Liu, R. C. Hider, *J. Med. Chem* **47** (2004) 6349-6362
10. B. Tamhina, K. Jakopcic, F. Zorko, M. J. Herak , *J. Inorg. Nucl. Chem.* **36** (1974) 1855-1857
11. K. Jakopcic, B. Tamhina, F. Zorko, M. J. Herak , *J. Inorg. Nucl. Chem.* **39** (1977) 1201-1203
12. K. Bolechala, K. K. Zborowski, *J. Phys. Org. Chem.* **22**, (2009) 994–1002
13. D. M. Reffitt, T. J. Burden, P. T. Seed, *Ann. Clin. Biochem.* **37**, (2000) 457-466
14. R. S. J. Harvey, D. M. Refitt, L. A. Doig, *Aliment. Pharm. Therap* **12**, (1998) 845-848
15. A. Kok-Peng, T. Sau-Fun, *J. Chem. Soc. Perkin Trans II* (1979), 1525-1526
16. Han Y., Xu Q., Hu J.N., *Nutrients.* **7**, (2015) 682–696
17. M. A. Spielmann, M. Freifelder, *J. Am. Chem. Soc.* **69**, (1947) 2908-2909

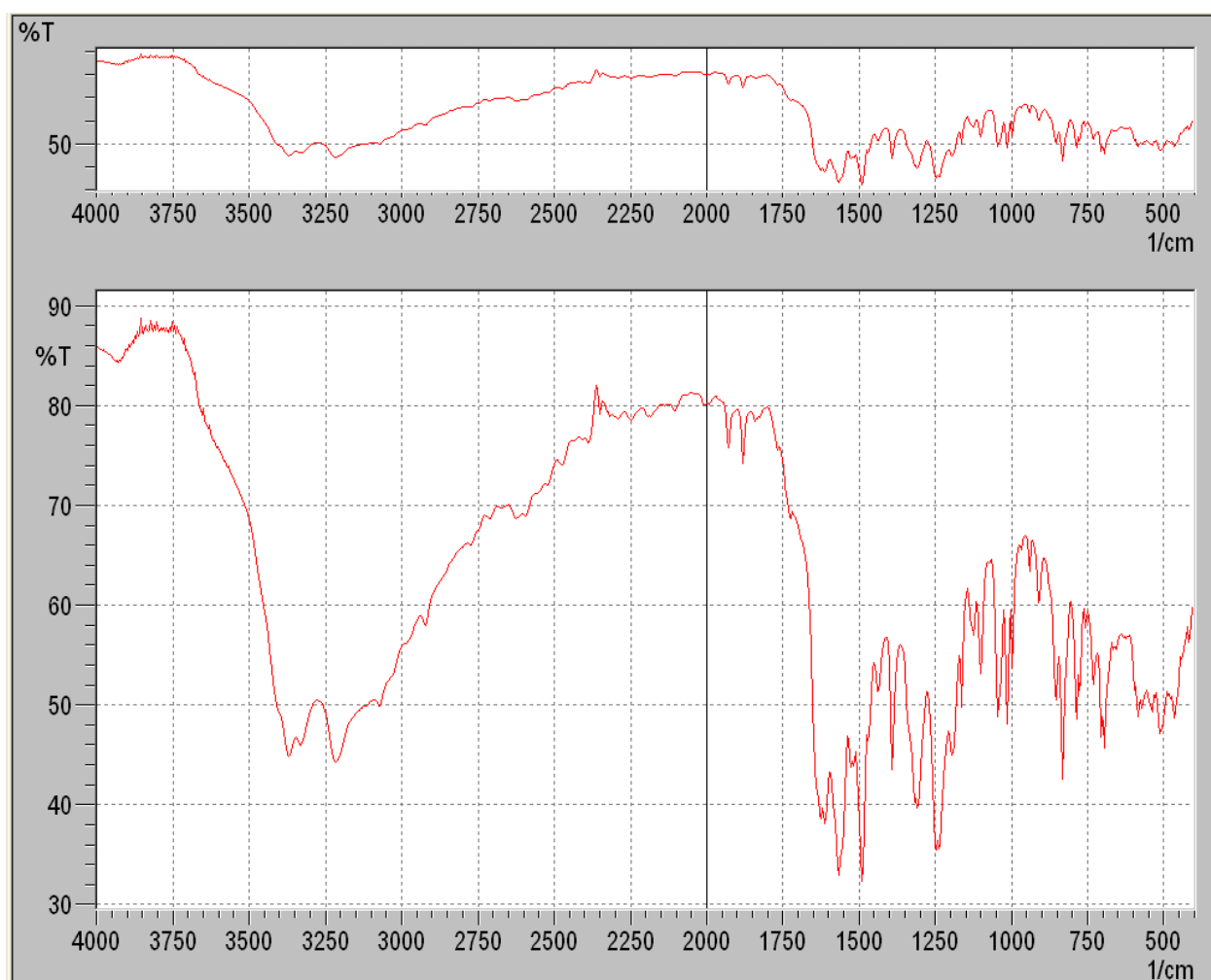
18. S. Torii, H. Tanaka, T. Anoda, Y. Simizu, *Chem. Lett* (1976), 495-498
19. T. Hedlund, L. O. Ohmann, *Acta Chem. Scand. Ser. A* **A42**, (1988) 702-709
20. D. G. Maxton, R. P. Thompson, R. C. Hider, *Br. J. Nutr.* **71**, (1994) 203-207
21. C. R. Chitambar, *Curr. Opin. Oncol.* **16** (2004) 547-552
22. L R. Bernstein, T. Tanner, C. Godfrey, B. Noll, , *Met. Based Drugs* **7** (2000) 33-47
23. M. A. Jakupec, M. Galanski, V. B. Arion, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, *Dalton Trans.* (2008) 183-194
24. M. Groessl, A. Bytcek, C. G. Hartinger, *Electrophoresis* **30** (2009) 2720-2727
25. J. Narasimhan, W. E. Antholine, C. R. Chitambar, *Biochem. Pharmacol.* **44** (1992) 2403-2408
26. Z.D.Liu, R.C.Hider, *Med.Res.Rev.***22**, (2002) 26-64
27. S. Chaves, P. I. Dron, F. A. Danalache, D. Sacoto, L. Gano, M. A. Santos, *J. Inorg. Biochem.* **103**, (2009) 1521-1529
28. T. P. A. Kruck, T. E. Burrow, *J. Inorg. Biochem* **88**, (2002) 19-24
29. M. A. Santos, M. Gill, L. Gano, S. Chaves, *J. Biol. Inorg. Chem.* **10** (2005) 564-580
30. M. A. Santos, S. Gama, L. Gano, G. Cantinho, E. Farkas, *J. Chem. Soc. Dalton Trans* (2004) 3772-3781
31. M. A. Santos, S. Gama, L. Gano, E. Farkas, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 1845-1852
32. R. Grazina, L. Gano, J. Sebestik, M. A. Santos, *J. Inorg. Biochem.* **103** (2009) 262-273
33. J. Xu, P.W. Durbin, B. Kullgren, S. N. Ebbe, L. C. Uhler, K. N. Raymond, *J. Med. Chem.* **45** (2002) 3963-3971
34. Harris R. L. N. *Aust. J. Chem.* (1976) **29** 1329 -133
35. K. Jakopčić, B. Tamhina, F. Zorko, M. J. Herak, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **39** (1977) 1201–1203
36. Ž. Car,* V. Petrović Peroković i S. Tomić Pisarović, *Kem. Ind.* **65** (2016) 595–604

37. L. Saghaie*, M. Mirmohammad Sadeghi and A. Nikazma, *Res. Pharm. Sci.* **1** (2006) 40-48
38. A. Gojmerac Ivšić, V. Tomišić, Ž. Car, B. Prugovečki, S. Tomić, *J. Mol. Str.* **990** (2011) 237–243
39. A. Fassihi, D. Abedi, L. Saghaie, R. Sabet, H. Fazeli, G. Bostaki, O. Deilami, H. Sadinpour, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 2145–2157
40. Z. Zhang, S. J. Rettig, C. Orvig, *Inorg. Chem.* **30** (1991) 509–515
41. D. S. Kalinowski, D. R. Richardson, *Pharmacol. Rev.* **57** (2005) 547–583
42. Y. Yu, E. Gutierrez, Z. Kovačević, F. Saletta, P. Obeidy, Y. S. Rahmanto, D. R. Richardson, *Curr. Med. Chem.* **19** (2012) 2689–2702
43. A. M. Merlot, D. S. Kalinowski, D. R. Richardson, *Antiox. Redox Signal.* **18** (2013) 973–1006

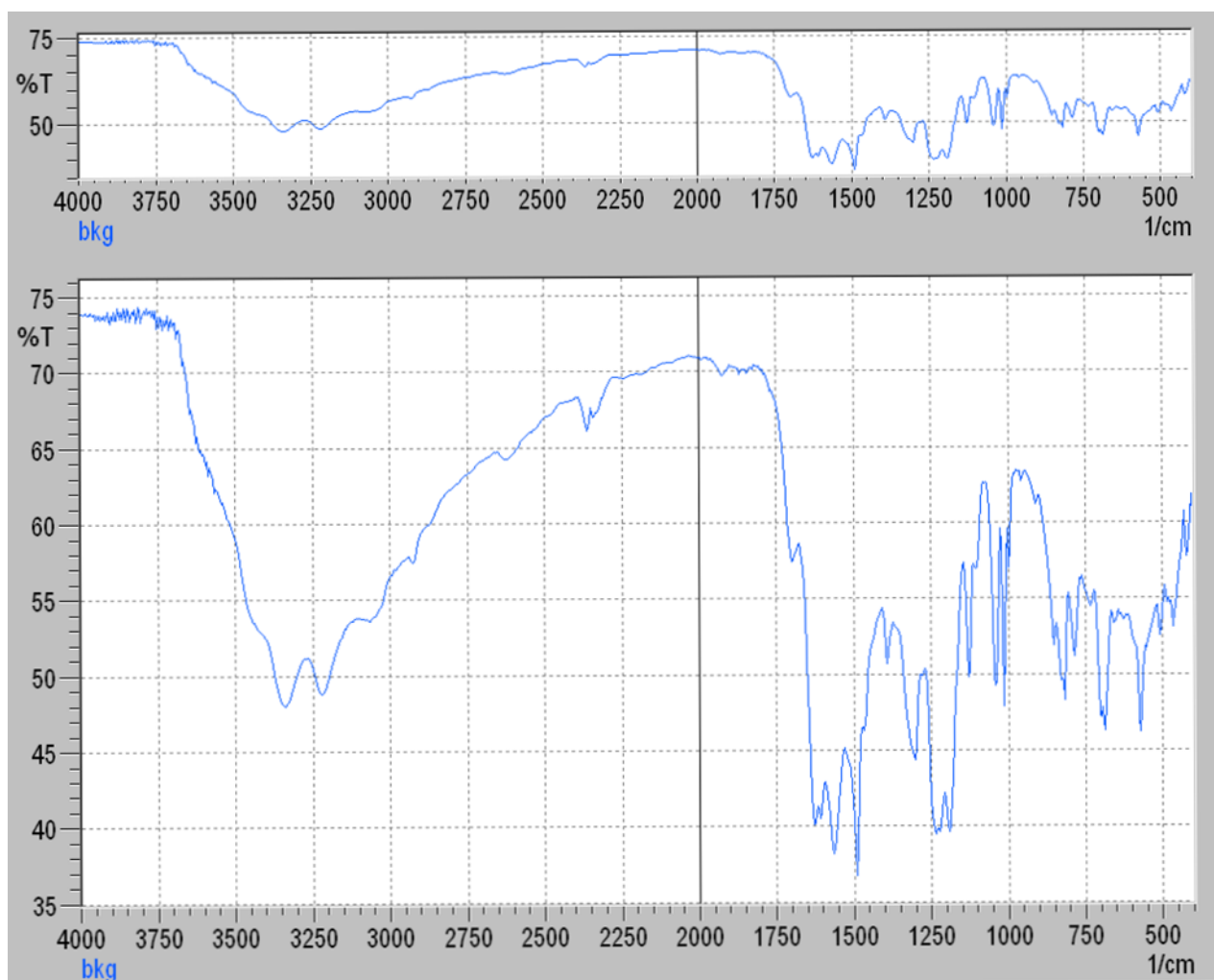
6. PRILOZI

6.1. POPIS OZNAKA KRATICA I SIMBOLA

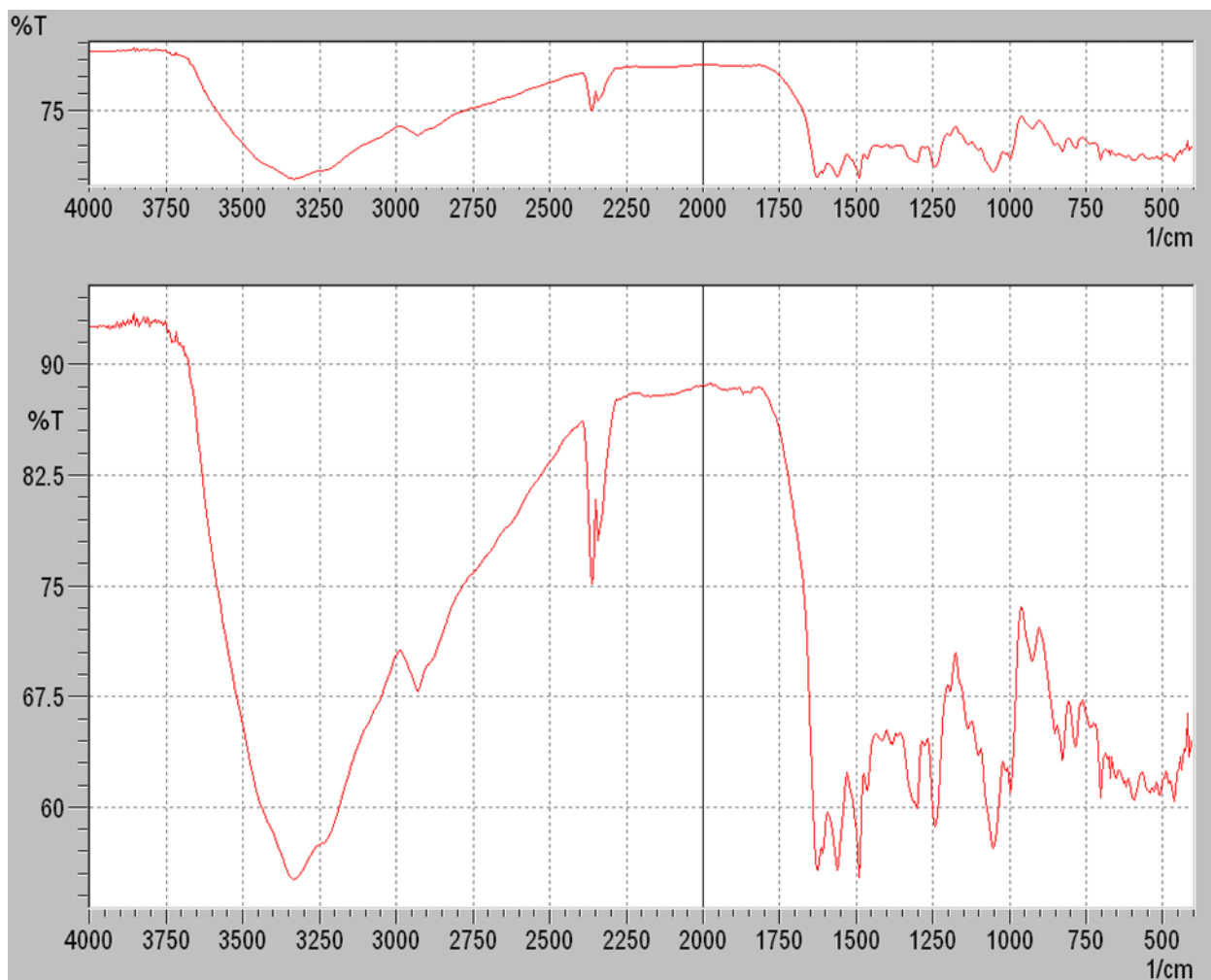
- | | |
|--------------------|------------------------------------|
| 1. HP | hidroksipiridinoni |
| 2. 1,2-HP | 1-hidroksipiridin-2-oni |
| 3. 3,2-HP | 3-hidroksipiridin-2-oni |
| 4. 3,4-HP | 3-hidroksi-piridin-4-oni |
| 5. DFO | desferioksamin B |
| 6. RR | ribonukleotid reduktaza |
| 7. <i>m</i> eng. | <i>Meta</i> |
| 8. <i>o</i> eng. | <i>ortho</i> |
| 9. <i>p</i> eng. | <i>Para</i> |
| 10. <i>p</i> -TsOH | p-toluensulfonska kiselina |
| 11. UV | eng. Ultraviolet (ultraljubičasto) |
| 12. IR | eng. Infrared (infracrveno) |



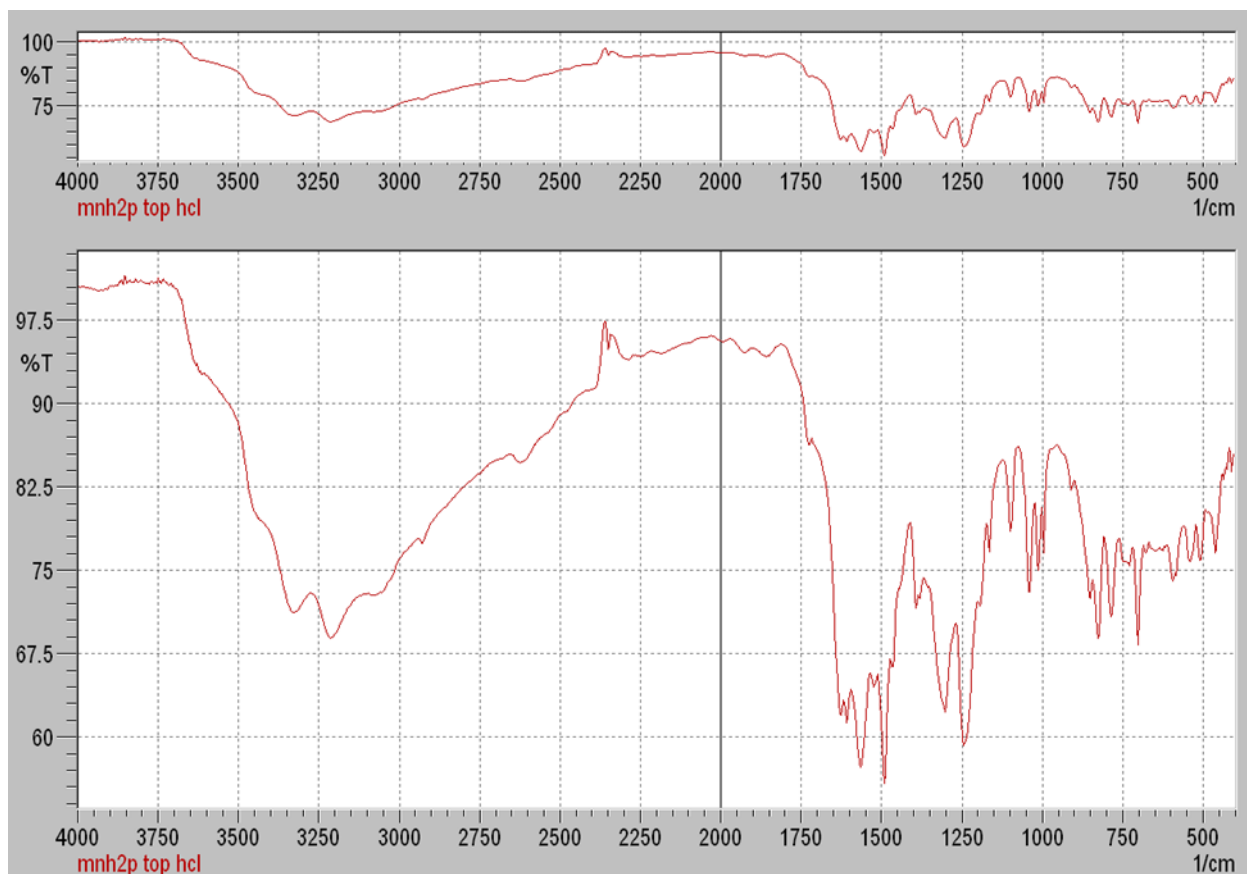
Slika 3. IR spektar spoja **3** dobivenog uz *p*-TsOH katalizator u autoklavu



Slika 4. IR spektar spoja **3** dobivenog uz *p*-TsOH kao katalizator zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluksiranje



Slika 5. IR spektar spoja **3** dobivenog uz HCl kao katalizator zagrijavanjem u vodenoj otopini uz refluks



Slika 6. IR spektar spoja **3** dobivenog uz HCl kao katalizator u autoklavu